

DENDRITIC POLYMER OF MULTIPLE ANTIGEN PEPTIDE SYSTEM USEFUL AS ANTI-MALARIAL VACCINE**Publication number:** JP3503539T**Publication date:** 1991-08-08**Inventor:****Applicant:****Classification:**

- International: **A61K39/015; A61K39/385; C07K7/06; C07K7/08; C07K14/00; C07K14/44; C07K14/445; C07K17/08; C07K19/00; A61K39/00; A61K39/002; A61K39/385; C07K7/00; C07K14/00; C07K14/435; C07K17/00; C07K19/00; A61K39/00; (IPC1-7): A61K39/015; A61K39/385; C07K7/06; C07K7/08; C07K7/10; C07K17/08; C07K9/00**

- European: C07K14/445; C07K17/08

Application number: JP19900507483 19900410**Priority number(s):** US19890336852 19890412**Also published as:**

WO9011778 (A
EP0423315 (A1
EP0423315 (A4
EP0423315 (A0

Report a data error he

Abstract not available for JP3503539T

Abstract of corresponding document: **WO9011778**

Multiple antigen peptide systems are described in which a large number of each of T-cell and B-cell malarial antigens are bound to the functional groups of a dendritic core molecule providing a high concentration of antigen in a low molecular volume. The products elicit a very strong immunogenic response.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑫ 公表特許公報(A)

平3-503539

⑬ 公表 平成3年(1991)8月8日

⑭ Int. Cl.⁸

識別記号

庁内整理番号

審査請求有

予備審査請求 未請求

部門(区分) 3(2)

C 07 K 17/08
A 61 K 39/015
39/385

8619-4H
8629-4C
8629-4C※

(全11頁)

⑯ 発明の名称 抗マラリアワクチンとして有用な多重抗原ペプチドの樹木状ポリマー

⑰ 特 願 平2-507483

⑱ 出 願 平2(1990)4月10日

⑲ 翻訳文提出日 平2(1990)12月12日

⑳ 国際出願 PCT/US90/02039

㉑ 国際公開番号 WO90/11778

㉒ 国際公開日 平2(1990)10月18日

優先権主張 ㉓ 1989年4月12日 米国(US) ③36,852

⑳ 発 明 者 タム, ジェームズ ビイ. アメリカ合衆国, 10021 ニューヨーク, ニューヨーク, イースト

シックスティースード ストリート 500

㉑ 出 願 人 ザ ロックフエラー ユニバー アメリカ合衆国, 10021 ニューヨーク, ニューヨーク, ヨーク

シティ アベニュー 1230

㉒ 代 理 人 弁理士 三宅 正夫 外1名

㉓ 指 定 国 A T(広域特許), A U, B E(広域特許), C A, C H(広域特許), D E(広域特許), D K(広域特許), E S(広域特許), F R(広域特許), G B(広域特許), I T(広域特許), J P, L U(広域特許), N L(広域特許), S E(広域特許), U S

最終頁に続く

序言(内容に変更なし)

請求の範囲

1. B-細胞エピトープ及びT-細胞エピトープの物質ペプチドより成る群から選ばれた、複数のT-細胞エピトープ及びB-細胞エピトープの分子が結合されている官能基を有する樹状ポリマーを含んで成る、抗原性生成物。
2. 少なくとも1種のT-細胞及びB-細胞のエピトープペプチドが縦1列で同一官能基に結合されている。請求の範囲第1項に記載の生成物。
3. T-細胞及びB-細胞エピトープペプチドがビー・バーゲン、ビー・ノールシ、ビー・ロエリ、ビー・マラリア、ビー・オヤレ、ビー・ファルシバラ上及びビー・ビバックスより成る群から選ばれた少なくとも1種のマラリア種のサーカムボロゾイト蛋白質に由来するT-細胞及びB-細胞エピトープペプチドから成る。請求の範囲第1項に記載の生成物。
4. B-細胞エピトープペプチドが
 - (a) (NANP) x;
 - (b) (DRAGGQPAG) x; ただしxはA又はDから独立に選ばれた;
 - (c) (QAQGDCGANAGQP) x;
 - (d) (DPPPPNPN) x;
 - (e) (YAAA(A)nGGG(C)mN)x; ただし、Yは独立にD又はCであり、nは0又は1であり、mは独立に0又は1である;
 - (f) 上記シーケンスの組み合わせ;
 - (g) 前述単位(乃至(4)の各々の置換配列)よりなるペプチド(式中、xは少なくとも1の整数である)

より成る群から選ばれたアミノ酸シーケンスを含んで成り;

そしてT-細胞エピトープがB-細胞エピトープと同一の物質のC5蛋白質に由来する1種以上のT-細胞エピトープである。請求の範囲第3項に記載の生成物。

5. 樹木状ポリマーの官能基にT-細胞エピトープペプチドが懸下、結合されており、そして同一物質に由来するB-細胞エピトープペプチドが、所望によって結合体を介して、前記T-細胞ペプチドの末端に懸下結合されている。請求の範囲第4項に記載の生成物。

6. 同一物質に由来する1つより多いT-細胞エピトープペプチドが上記物質に由来する少なくとも1つのB-細胞エピトープペプチドと共に含まれている。請求の範囲第4項に記載の生成物。

7. 請求の範囲第1〜6項のいずれか1項に記載の生成物を免疫原性に有効な量で食んで成る、マラリアに対するワクチン。

8. 哺乳動物にマラリアに対する免疫性を与える治療が必要とされるときに、請求の範囲第1〜6項のいずれか1項に記載の生成物を免疫原性に有効な量で投与することを含んで成る、哺乳動物に抗マラリア免疫性を与える方法。

特開(内容に便する)

明 細 書

成マラリヤ菌に作用する有用な多量

抗原ペプチドの樹木状ポリマー

ワクチンはしばしば抗原を蛋白質、炭水化物、脂質又はリポソームのような抗体に結合して含む。斯るワクチンは有用なものであるが、多年の使用されてきた。しかし、それらワクチンに関して多岐の問題があることはこの技術分野で知られている。これらの問題の幾つかは抗体に関連する。抗体は天然物から単離されるので、それらはしばしば不純物が含まれていない。更に、使用がきまき、しかも骨の折れる情報についての努力にもかかわらず、天然のワクチン製法を完全に含まない生成物を提供することは困難で、しばしば不可能である。このようなワクチン製法はそれら自体抗原性となることである。それらワクチン製法はワクチンの使用としばしば並び付いた固ましくない副作用、特に発熱と過敏化を引き起こす。更に、抗原の濃度は、抗体と反応し、あるいは抗体の表面に吸着される抗原の量が均一でないためにバッチ毎に変化することがある。この問題は成マラリヤ菌に感染したワクチンを製造することの困難を増し増加させた。

マラリヤは世界中で2億人の人に影響を及ぼすものであるため成マラリヤ菌の特に重要な特徴であるが、免疫予防は今までに開発されていない。げんし、腫瘍、及び及びマラリヤのスピロゾイトに対する防御免疫性は腸肝脾病スプロゾイトによる免疫化によって誘発されることは知られている。このスピロゾイトの主要蛋白質はサーカムスプロゾイト (circumsporozoite: CS) 蛋白質であるが、このCS蛋白質に対して向けられる抗体は寄生体の感染力を中和し、抗体が肝臓細胞に入るのを阻害することが知られている。かくして、CS蛋白質はマラリヤのスピロゾイト感染に對する

る成マラリヤ菌の感染の1つの重要な標的となった。CS蛋白質の免疫誘発B-細胞エピトープは全てのマラリヤ種のCS蛋白質に共通の1つの特徴であるCS蛋白質の塩基ドメイン内に含まれる。このB-細胞エピトープの蛋白質抗体としての感傷度トロソイドに結合させた成マラリヤ菌を用いて免疫化したマウスは10⁴個のスピロゾイトより高い抗体力価を對チラリン結合を形成させることが見いだされた。しかし、同様の方法を用いてヒトに接種する試みがなされているが、良好な抗体力価は誘発されていない。

最近、ビー・バーゲイ (P. Bergey) (ゲルマラリヤ) のCS蛋白質の幾つかのT-ヘルパー細胞エピトープも同定された [ロバート (Rovner) 等の *Eur. J. Immunol.*, **18**, 1951 (1988)] を参照されたい。ビー・バーゲイのCS蛋白質のB及びT-ヘルパー細胞エピトープの同定は今や、*J. Biol. Chem.*, **263**, 1719 (1988) に記載される。タム (Tam) とその共同研究者によって開発された方法を用いてエピトープを規定された樹木状ポリマーに結合させるM.A.P.法を用いる特定の、明確なやり方でこれらエピトープを1つの分子の中に組み込むことが可能にした。加えて、他のマラリヤ種のT-細胞エピトープも同定された。例えば、シニガダリア・エフ (Sinigaglia, F.) 等の *Nature*, **336**, 778 (1988) ; ビー・ファルシバラム (P. Falciopras) ; クリッパント・エー (Crisanti, A.) 等の *Science*, **240**, 1324 (1988) ; ビー・ファルシバラム、血液腫瘍 (クマー・エス (Kumar, S.) 等の *Nature*, **334**, 258 (1988) ; ビー・ファルシバラム スプロゾイト 等; グッド・F. エム・エス (Good, F.S.) 等の *Science*, **238**, 1059 (1987) ; グッド・F. エム・エス等の *Proc. Natl. A*

cad. Sci., **86**, 1199-1202 (1988) ; シニガダリア・エフ等 *Eur. J. Immunol.*, **18**, 633-636 (1988) ; 及びグッチャー・エム (Gutlinger, M.) 等の *EMBO J.*, **7**, 2555-2557 (1988) を参照されたい。

樹木状ポリマーは新しいポリマー群である。これらポリマーは分子容の単位当りの官能基濃度が通常のポリマーより高いことに特徴がある。それらポリマーは一般に少なくとも2個の官能基を有するコア分子に由来する2本以上の同一分枝構造に属する。このようなポリマーは米国特許第4,288,872号特許明細書においてデンクワルター (Denkwilster) 等により、米国特許第4,599,400号及び同第4,507,466号特許明細書を含めて幾つかの米国特許明細書においてトマリア (Tomalia) 等から述べられていた。これらのポリマーは、それらの構造がコアとしての1本の幹と数本の枝を持つ木として象徴することができること、しばしば樹木状ポリマーと称されている。木と違って、樹木状ポリマーの枝は全て実質的に同じである。

本発明の生成物は斯る樹木状ポリマー系に基づくもので、この系において枝はコア分子から放射状に伸びている枝に共有結合である。この系に多量 (multiple) 枝化ペプチド系という名称が付けられているが、本明細書では時にはM.A.P.とも称される。後記の説明から明らかであるように、本発明の生成物を形成するのに用いられる抗体、即ちコア分子のあるものはそれらコア分子が通常ではポリマーとはみなされないかもしれないような分子と同等のものである。しかし、それらの基本的構造は樹木状ポリマーと同様であるので、それらをそのように述べるのが便利である。従って、本明細書において用語「樹木状ポリマー」は時に本発明生成物の本質的特徴を定義するべく用いられる。この用語は

はポリマーと見なされるほど十分に大きい抗体分子だけでなく、3個程度の少数のモノマーを含むものも包含される。

樹木状ポリマーには応答性の抗体の抗体として有能に機能する能力があることがここに発見された。

本発明は樹木状ポリマーの構造についての簡単な説明から更によく理解できるであろう。

樹木状ポリマーは少なくとも2官能性のコア分子に作られる。コア分子にある官能基の数は少なくとも2つの分枝構造を形成し、その主単位も少なくとも2官能性である。分枝数ある2官能性単位は更に生長するためのベースとなる。

この系は特定の分子を参照すると更によく視覚化することが可能である。例えば、2個のアミノ基を持つリシンをそのカルボキシル基を介してペプチド結合でアラニン又はグリシン (これらは順次結合して留断となり得る) のアミノ基に結合させる場合、得られる分子は2個の留断のアミノ基を有することとなる。このジペプチドは第一世代と見なすことができる。ジペプチドは2個の追加リシン分子にペプチド結合を形成させることにより結合させて4個の留断アミノ基を持つ第二世代分子を生成させることができる。この方法を繰り返すことによって第三、第四又は更に高次の世代の生成物を形成することが可能である。各世代の共に留断アミノ基の数は幾何学的に増加する。この数はnを世代数とするとき、2ⁿで表わすことができる。

この化合物には特に高分子量のものはいないけれども、これらを樹木状ポリマーと称するのが便利である。

第1図はリシンに基づく8世代の樹木状ポリマーのコア分子を示すもので、8個の有効アミノ基は各ダイリシン結合体分子を介してペプチド抗原に結合されている。

同じタイプの反応をアスパギン酸又はグルタミン酸を用いて実施することが可能である。これら両アミノ酸は2°位の遊離カルボキシル基を有するポリアスパギン酸又はグルタミン酸を主成分とする2個のオルボキシル基と1個のアミノ基を有する。

これらタイプの合成を進行するのに必要な化学は公知でかつ利用可能である。アミノ酸に關し、反応が望まれない官能基を保護し、またそれら官能基が反応すべき時に露出されるようにそれら保護基を脱離させるための化学は多数の特許明細書及び技術文献中の論文に詳細に記載されている。

樹木状ポリマーは周知のメリフィールド (Merfield) 合案におけるように樹液上に生成させ、次いでそのポリマーから取り出すことが可能である。

トリアはコフ分子としてアンモニウム又はエチレンジアミンを用いた。この方法において、コフ分子はアクリル酸エステルとミカエル (Michael) 付加により反応せしめられ、そのエステルは加水分解により除去される。得られる第一世代分枝はアンモニウムの場合3個の遊離カルボキシル基を含有し、またエチレンジアミンを用いる場合は4個の遊離カルボキシル基を含有する。トリアはその樹木状ポリマーエチレンジアミンにより、続いてアクリル酸エステルモノマーにより順次成長し、そしてその配列を所望とされる分子量が得られるまで繰り返している。しかし、商業的には容易に分かるであろうように、樹木状ポリマーの各分枝は多数の選択された方法のどれによってもその長さを伸ばすことができる。例えば、各分枝はポリリン分子との多量反応により順次成長することが可能である。

エリックソン (Erickson) は高質的に任意の所望分子量を持つポリペプチドを固体樹脂支持体から生成させる古典的なメリフィ

はしばしば大量の母体上に保持された少量の抗原より構成される。抗原の母体として用いる樹木状ポリマーの他の重要な特徴は、正確な構造が分り、自から抗原性であり、破壊を耐え、あるいは他の望ましくない反応を及ぼす汚染物質を存在せず、抗原の正確な構造が分り、抗原が母体上に対称的に分布され、そして母体は1個より多くの抗原のベースとして利用することが可能で、そのため多価ワクチンを製造することができる、ということである。本発明の具体的ワクチンのベースとしてのMAPS法の主たる利点は、かび穴カサガイのヘモシアニン、破傷風のトキソイド及び牛の血清アルブミン等の天然源母体を使用する従来の系と違って、本発明の母体は抗原が特異的に位置で分配される点と、完全に定義される化学的に寓存するものであることである。更に、その抗原はその分子の大部分を占め、天然源母体の場合のように比較的少ない、定義されない割合の分子ではない。

本発明のワクチンの場合、コフ分子は通常の代謝経路に続いて体で取り除かれるようにリン等の天然源のアミノ酸であるのが好ましい。しかし、免疫において更に十分に説明されるように、天然のものでないアミノ酸、またはコープアミノ酸でないものでも使用することができる。コフ分子をつくる限に用いられるこれら酸又は他の任意の非対称分子はD型でも、あるいはL型でもどちらでもよい。

上記では樹木状ポリマーをポリアミドポリマーとして主として説明したけれども、本発明の母体は樹木状ポリアミドに限定されないことは容易に分かるであろう。少なくとも1個の利用可能な官能基を持つ広範囲の分子のいずれもコフ分子として設立し得るのである。例えば、プロピレンジリコールがポリエステル系樹木状ポリマーのベースとして設立し得る。これは酸は選択されたグリコ

ールド酸を利用した。この方法は樹木状ポリマーの製造に用いるので、そのポリマーを樹脂支持体に結合させる結合用分子は3官能性である。官能基の1個は樹脂に対する結合の中に含まれ、他の2個の官能基はポリマー主鎖の出発点として設立し、ポリマーは所望とされる分子量が得られたときに樹脂から脱離される。1つの標準的な開環反応は液体相水素で0°Cにおいて1時間処理する方法である。もう1つの更に簡便な方法はタム等が J. Am. Soc., 105, 6442 (1959) で述べているように液体水素とジメチルフルオロドとの液体相 (HFD/DMF) を利用するものである。この方法は副反応及びペプチドの損失を著しく低下させる。

デンケウオルターはその方法の1例においてリンをコフ分子として利用している。このコフ分子のアミノ基はウレタン基に転化することによって制御される。カルボキシル基はベンズヒドリルアミンとの反応によって封鎖される。それらウレタン基を加水分解すると、樹木状ポリマー主鎖の出発点として設立し、2個の遊離アミノ基を持つリンのベンズヒドリルアミドが生成する。

樹木状ポリマーを製造するのに利用可能な方法のうちの3方法についてのこの簡単な概観は商業的に現在の技術の基本原理を暗示するのに十分なものである。これらの方法はまた当業者がポリマーの異なる特徴を指示している。その最も重要な特徴の1つは小さな分子等の中に非常に多数の利用可能な官能基を有することである。その結果、抗原をこのような有効官能基に結合させることによって小容量で高濃度の抗原が生成可能となることである。更に、得られる分子主鎖は相対的に小さな母体上に抗原を高割合で含有する。このことはワクチンのベースとして使用された従来の生成物とは著しく異なる点である。これら従来の生成物

ール又はアミンと共にポリエステル又はポリアミドを生成させるコフ分子として設立することができ、ジソシアナートはポリウレタンを生成させるために用いることができる。重要な点は、コフ分子は少なくとも2個の利用可能な官能基を有し、それら官能基より、各分枝上に同様に少なくとも2個の利用可能な官能基又は係止 (anchoring) 基を有する追加の分子との逐次付加型反応により同一の分枝値を生成させることである。コフ分子が2個の利用可能な官能基を有し、そして各世代次のものが2個の利用可能な官能基を有する最も単純な場合は、本発明で用いられるマラリヤ抗原のT-細胞及びB-細胞の抗原が係止される得る係止部位の数はnを世代数として(2)ⁿで表わされる。

樹木状ポリマー化学の更に完全な議論についてはタマア等の Polymer Journal, 1, 7 (1), 1, 17 (1959)、アホニ (Aharoni) 等の Macromolecules, 15, 1093 (1982) 及び次の米国特許明細書:

第4,289,872号	第4,558,120号
第4,376,861号	第4,568,737号
第4,507,468号	第4,587,339号
第4,515,920号	第4,599,400号
第4,517,122号	第4,600,535号

に注意を向けられたい。

引用した全ての特許、特許出願及び文献はそれらの全体を本明細書で引用、参照するものである。

発明

本発明は、現在好ましい態様において、得られる構造がTエトープペプチド及びBエトープペプチドの両者を有するように複数の係止部位をC5蛋白質のようなマラリヤ蛋白質の抗原性T

一糖配エビトープ及びB一糖配エビトープに共有結合して有する樹木状ポリマーベースを含有する多量抗原ペプチド系を提供するものである。樹木状ポリマーは少なくとも2個の官能基を有する中コア分子を含み、そのコア分子には末端官能基を有する分子分枝が共有結合されている。分枝上の末端官能基はエビトープペプチドに共有結合されている。抗原分子は本明細書では主としてペプチド抗原として述べられるが、それはペプチド抗原、更には抗原に限定されるものではない。かくして、自らは抗原性でないペプチドがそれがコア分子に結合されると抗原性となることである。

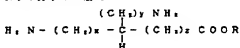
選択された抗原は弱毒に合成（この技術分野で周知のように組換えDNA性一これに限定されない一を含めて色々合成法で）するが、他の方法で得、抗体に結合させることができる。抗原は抗体ポリマーの各分枝を合成のペプチド合成法を用いて延長することによって抗体上に合成してもよい。

例1図は本発明の実施に際して用いることができる樹木状ポリマーの構造を示す。これより分かるように、そのポリマーは3世代の樹木状ポリリンシ生体物である。このポリリンシは従来の図解法でバム (Pam) 樹皮又はポップ (Pop) 樹皮上にそのポリマーを生成させることによって製造することができ、ミッチェル (Mitchell) 等の J. Org. Chem., 42, 2848 (1977) 及びバム (Tae) 等の J. Am. Chem. Soc., 100, 8117 (1978) を参照されたい。ポリマーを次に図解から、好ましくはHPLC法を用いて解離させる。図示されるように、この樹木状ポリリンシはベンジルリンカー (linker) を介して樹皮に元々結合されているグリシンリンカーから作られたものである。他のリンカー、例えばアラニンも用いることができる。リンカー

通常不要である。

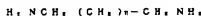
本発明を、便宜上、主としてコア分子としてのポリリンシについた生成物に適用される態様として説明した。事実、グリシン、オルニチンのような分子に似たポリリンシ、ノルポリリンシ及びβ-アミノアラニンは本発明の生成物をつくるための好ましい分子である。と言うのは、それらは入手が比較的容易であり、処理が容易であり、しかも良好な収率を生ずるからである。

このような分子は一般式



(式中、x、y及びzは0~10、好ましくは0~4の整数である。ただし、それらの少なくとも1つは1であり、かつそれらのx、y及びzは同一炭素原子には結合することができない。) で表わすことができる。最も好ましい分子においては、x、y及びzの総数は2~6であり、アミノ基は少なくとも2個のメチレン基で隔てられている。

他の好ましいコア分子にエチレンジアミン及びそれより長い鎖を持つ同様の分子、例えばプロピレンジアミン及びブチレンジアミンがある。このような分子は一般式



(式中、nは0~10、好ましくは0~3の整数である) で表わすことができる。

勿論、アミノアモコア分子として用いることができる。

非常に多量の病変に対する合成ワクチンの開発が、ワクチンは自然蛋白質に基づく必要がなく、自然蛋白質の低分子重セグメントに基づくものでよいと言うことが認められるようになったため

は如論使用を望いてもよいし、あるいは複数のリンカー分子を用いてもよい。

第1図は各分子が8個のペプチドを持つ樹木状ポリマーを示す。ここで、ペプチドの鎖のつなは、マラリヤ、例えば**アラスキウム・バーゲル** (*Plasmodium berghei*)、**アラスキウム・フルルシ・バラム** (*Plasmodium falciparum*)、**アラスキウム・ビックス** (*Plasmodium vivax*)、**ビー・ロゼリ** (*P. rogersi*)、**ビー・マリアネ** (*P. gallinaceum*)、**ビー・オヤレ** (*P. oylei*)、**ビー・シノキル** (*P. cynocephali*)、**ビー・ノールシ** (*P. knowlesi*) 等の原因アラスキウム種の、各末端リンシ抗原上の利用可能な官能基の各々に直接結合したT一糖配エビトープペプチドを、他は同様に結合した原因アラスキウム種のB一糖配エビトープペプチドを、ポリマー上のB一及びT一エビトープは同じマラリヤ種のものである。本発明は単一からの1個だけのT一及びB一エビトープの組み合せを有するポリマーに限定されない。例えば、**ビー・ビックス**のCS蛋白質からのT一及びB一エビトープと**ビー・フルルシ・バラム**のCS蛋白質からのT一及びB一エビトープを同時に有するMAP5も本発明の範囲内である。更に、ペプチドの、T一ヘルパーエビトープとして機能する能力は同一マラリヤ種からのB一糖配エビトープが共存することにも必ず依存している。従って、T一ヘルパーエビトープペプチドとB一糖配エビトープペプチドの交差能 (cross-species) の組み合せを考慮されるものである。選択されたエビトープの構造は比較的細かい。例えばB一14糖基であるとき、ポリリンシをグリシン、アラニン又はβ-アラニンの単純なトリマー又はテトラペプチド等のリンカーで延着することが最もよいことが観察されている。しかし、強毒が1個より多い抗原ペプチドについてはリンカーは

に、最近著しく促進された。これらのセグメントは、通常免疫原性の決定因子又はエビトープと称されるが、自然蛋白質の抗原を有するスロゾイトによる形態に対して動物の抗体の産生を助成することができる。そして感染性ベクターのみ付きによって宿主細胞に導入される。

本発明はロモノ (Mosero) 等がloc. cit. において述べるもののようなマラリヤ結核のT一及びB一糖配エビトープペプチドに関する。この文獻を本明細書において引用、参照するものとする。限定される訳ではないが、**ビー・バーゲル**のT一糖配エビトープペプチドの鎖のつなを下記に例示する。

表 示

YNNYTVKLLADL	1
59 69	
HEKIEHNKRLKLP	N
80 92	
HDSDYTPAENI	3
249 260	
KXINDGSTITENS	B-4
265 276	
GGCIRVYKRGSKH	5
283 296	
GSIFNIVSGDLG	6
317 328	
HEKIEHNKRLKSPDPDPDPDPDPDPDPDPDP	N + 17.1
KXINDGSTITENSDDPPPPPPPPPPPPPPPPPP	B-4 + 17.1

最後の2つの抗原N+17.1とB-4+17.1はT一糖配エビトープN又はB-4とB一糖配エビトープとの組合せを表わす。

エビトープ17.1とその製造に関してはここに引用、参照するものとする(Zavala) 等の J. Exp. Med., 156, 159 (1987) に記載されている。チーカムスボロゾイ蛋白質の場合、B-細胞エビトープ(これは偶然にも免疫優勢エビトープである)は事実上反複性で、例えば ビー・バーゲル については (DPFPPMP)x; ビー・ビバツ については (DRAGGPGAG)x 若しくは (DRAGGPGAG)x 又は両者の組み合わせ、ビー・ファルシ については (NRP)x; ビー・ノレシ については (SAGGGAGAGGPG)x 等である。ただし、x は少なくともある種のマウリヤ種については2である。これら基小線単位長の連続配列の繰返しでB-細胞エビトープペプチド、例えば (PNAH)x も生成する。

現在商業的に、あるいは公知の合成法等では単離法で入手可能な抗原ペプチドの幾つかを以下の第1表に示す。この表には第2欄に示される両方又は両方と関係がある蛋白質のセグメントであるペプチドが示されている。参照数字はそれらペプチド及びそれらを得る方法を示している刊行物を指しているものである。アミノ酸については常用の略号が使用されている。

第1表

M A P を使用するワクチン開発に適用したペプチド配列			
ペプチド	抗原性/抗原(蛋白質)	参照数字	
A. H-(Asn-Ala)-Asp- Pro-Glu-CH ₃ > 3	マウリヤ、 <u>ビー・ノレシ</u> ペプチドのC5蛋白質	1	
B. H-(Gly-Asp-Arg-Ala- Asp-Gly-Glu-Pro-Ala)- OH, n > 2	マウリヤ、 <u>ビー・ビバツ</u> ペプチドのC5蛋白質	2	
C. Glu-Glu-Ala-Asp-Val-Glu- His-Asp-Ala	マウリヤ、 <u>ビー・ファルシ</u> ペプチドのP1355	3	

られる。これらのT-細胞ペプチドがT-ヘルパーペプチドであるかどうかを証明するには、それらT-細胞ペプチドについて、そのT-細胞エビトープペプチドとB-細胞エビトープペプチドとを共有結合させ、かくして形成される免疫複合体を用いてB-細胞エビトープに対して抗原の免疫試験を行う。

前記において、アルファベットの文字はペプチドの技術分野において当業者が使用しているものと同じ意味を有する。これらは次の通りである。

A-アラニン	M-メチオニン
C-システイン	N-アスパラギン
D-アスパラギン酸	P-プロリン
E-グルタミン酸	Q-グルタミン
F-フェニルアラニン	R-アルギニン
G-グリシン	S-セリン
H-ヒスチジン	T-スレオニン
I-イソロイシン	V-バリン
K-リシン	W-トリプトファン
L-ロイシン	Y-チロシン

本発明の1つの特定の利点は樹木状ポリマーが2種以上の異なるマウリヤ抗原の複合体として設立し得ることである。これは多価ワクチン(即ち、1つより多いマウリヤ種に対して向けられるワクチン)の製造に、及び/又はマウリヤ寄生体の異なる段階に対するワクチンの製造に特に有用である。マウリヤに感染する抗原抗原とB-細胞抗原との両者が第2図において非限定形式で例示される様々な配置のいずれかで樹木状ポリマーに結合されている本発明の抗原生成物から製造されるワクチンは極めて高い抗体価をつくり出し得るもので、特に有用である。

- D. Asn-Ala-Glu-Asn-Lys-
Glu-Glu-Leu-Thr-Ser-
Asp-Pro-Glu-Gly-Glu-
His-His
マウリヤ、ビー・ファルシ
ペプチドのマロゾイ抗原 4
- E. Asn-Ala-Asp-Pro-Asp-
Val-Asp-Pro-Asp-Ala-
Asn-Pro
マウリヤ、ビー・ファルシ
ペプチドのC5蛋白質 5
1. ザバ等の Science, 228, 1436 (1985)
 2. マククチャン (McCutcheon) 等の Science, 230, 1381 (1985); アーネット・デー・イー・ (Arnet, D. E.) 等の Science, 230, 815 (1985)
 3. ウッドサンダグベツ (Woodward-Gapich) 等の Science, 231, 571 (1986)
 4. ラベツ (Ravetch) 等の Science, 227, 1593 (1984)
 5. ナーディン・イー・ユーチ (Nardin, E. B) 等の Science, 245, 1603 (1989)
- 更に、マウリヤT-ヘルパー細胞エビトープペプチドは、シンニグリア (Sinisella) 等の文献等において前記した通り、肯定することができる。簡単に述べると、あるマウリヤ蛋白質のアミノ酸配列が分かること、その蛋白質のフラグメントに相当するペプチドは合成可能で、かつ哺乳動物に注射することが出来る。或いは、T-細胞を免疫化された哺乳動物の血液試料から回収し、免疫化に使用したペプチドの存在下で、試験管内でインキュベートすることができる。このようなペプチドは、T-細胞がそのようなペプチドの存在下でそのようなインキュベーション中に増殖するならば、T-ヘルパー細胞エビトープペプチドであると考え

本発明のT-及びB-細胞エビトープをMAP基質に共有結合させると、得られる生成物は抗原C5蛋白質又は層状したスボロゾイにより遠心において得られたものより10-100倍大きい抗体応答水準を引き出すことが発見された。更に、マウスにおいてはB-細胞エビトープはMAP基質に支持されなかったが、あるいはB-細胞エビトープとT-細胞エビトープMAPの混合物は非常に強い抗体応答をもたらし、防御機能を示さなかったことも観察されている。本発明の現在のところでは最も好ましい候補はT-エビトープペプチドとB-エビトープペプチドとの両者が樹木状ポリマー基質の同一官能基上にタンデムで結合されている場合の候補である。

本発明の具体的に選択されたB-エビトープとT-エビトープと第2図に図示される通り様々な異なる配置でMAP基質に置くことができる。第2図はビー・バーゲルについて、それぞれP P P N P D P P P N P N D と K Q I R D S I T E E W S を含むB-エビトープ(白抜きブロック)とT-エビトープ(黒塗りブロック)との交互配置を示す。

第2図において、T-(4)とB-(4)とは4本の分枝線を持つエビトープは1つだけであるマノマープである(再び、C5蛋白質の免疫優勢B-エビトープは少なくとも2つの最近基単位を同時に含む)。T-(8)とB-(8)とは同様であるが、分枝線は8本である。T-(8)及びB-(8)-Tにおいては、樹木状ポリマーの分枝線上に8つのT-エビトープ又はB-エビトープが、またポリマーの枝に1つのB-エビトープ又はT-エビトープが存在する。B-T-(4)、T-B-(4)、B-T-(8)及びT-B-(8)がエビトープがタンデムで配置されている本発明の現在のところ好ましい生成物を提示するものである。

本発明ではマラリヤ・T-エリトープ及び同B-エリトープの組み合わせと数倍多量添加され、それら完全に完全な範囲内であることは当業者であれば当然分かるだろう。

B-エリトープとT-エリトープとが分枝鎖上に交互に配置されている、即ち一方の分枝鎖がB-エリトープだけを有し、他方の分枝鎖はT-エリトープだけを有している本発明の生成物をつくることも可能である。例えば、第2図において、T/B(8)はT及びBのマラリヤ抗原を交互に配置して有する分枝鎖1本の樹木状ポリマーベースを意味するもので、これも本発明の範囲内である。T/B(4)はポリマーベースの分枝鎖が4本だけである点を除けばT/B(8)と同様である。

これは、アミノ基が異なるアミノ封鎖基で封鎖されており、封鎖基の一方は酸加水分解に対して安定であり、封鎖基の他方がアルカリ加水分解に対して安定である。リシンのようなジアミン化合物に基づく樹木状ポリマーを用いることによって直交防蝕性を高いて達成することができる。(例えば、第2図、B及びDの模式図を参照されたい。)

フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)は塩基に対して不安定な保護基であって、酸性環境に対しては完全に安定である。t-ブチルオキシカルボニル封鎖基(Boc)は5.0%トリフルオロ酢酸のような酸性条件下で安定である。Boc-Lys(Boc)-OH、Boc-Lys(Fmoc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH又はFmoc-Lys(Fmoc)-OHを選択することによって、1個の抗原をリシンのα-アミノ基に対して、もう1個の抗原をω-アミノ基に導入することが可能である。ペプチド合成の当業者であれば、逆の封鎖基と他の樹木状ポリマーを用いて同一タイプの生成物を合成する方法を容易に高出することができよう。

ルジンは水中水型でも水中油型でもどちらでもよい。例えばアカシア粉末、又はトリトン(Triton)のようなアルカリポリエーテルアルコールのスルホン酸エステル若しくは硫酸エステルを含めて親水型上許容し得る乳化剤であればどれでもよいことができる。

上記組成物のどれにでもソルビトール又は加水分解ゼラチンのような安定剤を添加することができる。ネオマイシンのような免疫物質又は感染を予防する他の抗原剤と配合することは異例なことではない。

本発明の生成物は高い抗体価を与えるので、多くの場合それら生成物はキャリア又はアジュバントとして使用される。しかし、アジュバントを用いる場合、それは哺乳動物の免疫反応系を刺激するのに適宜用いられるもののいずれかとも選択することができる。これには、例えばフロンドアジュバント(完全又は不完全)、アジュバント85(ビナツフ倫、マンナイド(mannid))、モノクレート及びモノスチリリル酸アルミニウムを含有する)、及び燐酸アルミニウム又は明ばんのような緩衝剤ゲル;死菌ゲル(Killed Bordetella)、被膜菌トキソイド、グフトリプトキソイド、ユラミドペプチド、水酸化アルミニウム、サロニン等があるが、前記のように本発明のポリマー塩基を用いる場合はこのようなアジュバント又はキャリアは必要がない。フロンドアジュバントは、代謝されない抗体を含有し、種痘的な発がん剤であるので、ヒト用又は動物に付く動物用のワクチン給付には最悪使用されない。それは食物に付かない動物用のワクチンに用いることができる。動物用のゲルは市販の動物ワクチンに広く用いられている。

本発明のワクチンは上記の一般的な性質を持つ親水型上許容し得る

本明細書に示され、図示された構造について多くの説明が可能であることは当業者には明白であろう。例えば、樹木状ポリマーはセグメントがジスルフィド橋を介して結合されている構造を有してもよい。断る構造は低分子状態のような能動的な酸化剤で酸化される保護されたシステムを含有している樹木状ポリマーから容易に形成することができる。

も1つの例として、第1図を参照して説明すると、樹木状ポリマーの根にあるグリシン、芽生遊離グリシンは樹木状ポリマー分子の分枝鎖上にあるペプチド抗原(図中)でもよいあるいは異なるものでもよいT-又はB-マラリヤペプチド抗原に結合させるか、又はそのようなT-又はB-マラリヤペプチド抗原で置換することができる。T-及びB-ペプチド抗原自体は他のリシン又は同様の残基を結合させて追加的分枝鎖を与えることができる基盤として役立つ。ここで、これら追加的分枝鎖は更に追加のペプチド抗原、抗原物質又はペプチド抗原を結合させてもよい。

本発明の生成物は当業者に公知の方法のどれかを用いてヒトを含めて哺乳動物のマラリヤ感染に対して防御するのに有用なワクチンを製造するのに用いることができる。これら生成物は、例えば、製剤上許容し得る塩基又は緩衝剤、例えば不活性な塩、適当には、ゴマ酸、ビナツフ倫又はオリーブ油のような植物油に懸濁させることができる。測定として、本発明の生成物は約5.6-7.4の水性等張緩衝液に懸濁させてもよい。このようは塩基は、典型的には、塩化ナトリウムより等張とされ、くえん酸ナトリウム(くえん酸により又は緩衝剤により調節される。緩衝剤はメチルセルロースのような増粘剤を用いて増粘してもよい。

ワクチンはまたエマルジョン形態として調製してもよい。エマ

るキャリアである本発明の抗原性生成物、即ち免疫応答、即ち哺乳動物における防御抗体応答をもたらすのに十分な量を選択されたT-又はB-細胞エディトールと共に含んで成るものと定観することができる。有効量は非常に少ない。有効量は、公知のように、抗原、より実効的。有効量を定する量はワクチンが第一治療として意図されたものであるのか、それとも増強剤として意図されたものであるかに依存して変わるだろう。

MAPの量は特定の免疫原、種々の被検対象において免疫原が引き出す応答、及び異種キャリア又はアジュバントの存在若しくは非存在に依存して変わる。一般的に言えば、約1-約1,000マイクログラムの範囲内の量のMAPが予定される。最少量は、この技術分野で周知のように、抗体価、その他哺乳動物の免疫応答の諸パラメータの測定を含む日常的な実験により確かめることができる。最適免疫化が得られる。

本発明の生成物は、使用直前に親水型上許容し得るキャリアを用いて再構成されるだけの凍結乾燥物として提供するのが便利であるだろう。

ワクチンの調製と付随事項についての追加情報は周知である。例えば、1986年8月20日公開の、スミスクリン・ベックマン(SmithKline Beecham)の欧州特許出願第A、191,748号、1986年8月27日公開の、スミスクリン・ベックマン等の欧州特許出願第A、192,626号、米国特許第4,693,994号、同第4,707,357号、同第4,735,799号及び同第4,767,622号明細書を参照されたい。

引用された特許、特許出願及び文献は全てその全体を本明細書において引用、参照するものとする。

かくして、本発明はまたマラリヤ感染による感染に対して哺乳

動物に免疫を与える方法を提供するものである。この本発明の方法はマラリヤト及びB-ペプチド保有MAPを食んで成る化合物又は組成物を、好ましくは哺乳動物がマラリヤ菌面にさらされる前に哺乳動物にマラリヤト及びB-ペプチド保有MAPを食んで成る化合物又は組成物を免疫学的に有効な量で投与することから成る。ここで、上記有効量はマラリヤ菌面による感染に就いて宿主哺乳動物に起こる寄生虫血症を抑制するのに有効な量である。

マラリヤ菌面ト及びB-ペプチド保有MAP及び任意成分としての薬劑上許容し得るキャリアー又は稀釈剤を含んで成る免疫原性化合物を有効量で含む、マラリヤのスポロゾイト、その他の段階でのマラリヤ感染を抑制するのに有用なワクチンも要請される。

当業者には明白なように、本発明の生成物は、その用途を理解してしようと、当業者には周知の方法で製造することができる。
Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A., 85, 5409 (1988); プロセスネット (Prosonet) 等のJ.Mol.Chem., 265, 1719 (1988); 及びチュナグ (Chunag) 等のProc.Natl.Acad.Sci., U.S.A., 86, 4929 (1988) に記載されたタム (Tam) 法はその例である。これらの文献を全て本明細書において引用、参照するものとする。

MAP合成に適用可能な若干の一般の製造法は当業者にとって助けになるだろう。これらは次の通りである:

1. この合成に要するカップリング時間は一般に長い(2-4時間)。
2. ジメチルカルムアルドが一般的には二硫化メチレンよりも適当な溶剤である。

抗 体	既 往 的 法	
	IFA力価	RIA力価
	スポロゾイト	FCSS蛋白質
スポロゾイト*	2,048	8,192
組換えCS蛋白質*	2,048	2,048
モノマーBT-ペプチド*	800	1,024
BT-MAP (4)*	128,000	408,000
BT-MAP (4)	32,000	400,000
BT-MAP (8)	24,000	100,000
BT-MAP (8)	54,000	400,000

a. H-2^a ハロタイプ (Haplotype) のマウス4匹(B10、A菌株)に感染済みビーバーゲンのスポロゾイトを投量1×10⁶で2週、2週間隔で静脈注射した。血清を採取、最後の注射後10日間隔して置いた。最高滴度の血清の凍結と凍結して戻される抗体力価を間接免疫蛍光検定法(IFA)ではグルテナルゲルヒド固定ビーバーゲンスポロゾイトを、放射線免疫検定法(RIA)では組換えCS蛋白質を用いて得た。

b. H-2^a ハロタイプのマウス4匹(A/J菌株)に日数0ではCFIA中に乳化させた組換えCS(rFVS)ビーバーゲン蛋白質250µgを1. p. 注射し、また日数15日ではIFAでrCS蛋白質250µgをS. C. 注射した。10日後に血清を採取した。

c. H-2^a ハロタイプマウス5匹(A/J菌株)にビーバーゲンCS蛋白質免疫原様体の凍結単位が2匹、ビーバーゲンCS蛋白質凍結ト-凍結エピソードが1匹間隔されるペプチド免疫原を各50マイクログラム1. p. 注射した。免疫化の計画及び検定方法は組換えCS蛋白質についてのものと同様で

8. ペプチド樹図は再得価及び極めて困難であるので合成のいかなる段階でも製造すべきでない。

4. カップリングはその完成について定量的ニヒン法でよく監視すべきである。

5. MAPは改良製造法で、微細触媒による場合の副反応を回避するためにジメチルカルムアルド中でHFD又はTDMSAを用いて樹図から一重及び解離される(タム等のJ. Am. Chem. Soc., 108, 8442 (1986)及びJ. Am. Chem. Soc., 108, 5242 (1986))。

6. MAPは樹図支持体から解離された後強く疎水性傾向がある。静置は、解離反応の望ましくない汚染物質の増加、例えばパーフルオロ及びビタフルフルを除去すべく、単量及びメルカプトエタノール中8Mの過酢酸溶液中、塩基性、強力酸性条件下での長時間還流で行うのが一番良い。所望によっては、高性能のゲル透過クロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーを用いて更に精製することもよい。ほとんどの場合、MAPは更なる精製なしで直接使用可能である。

要しはマウスに免疫原性を引き出す本発明生成物の効果を測定するために行った幾つかの試験の結果を要約して示すものである。これより、本発明のMAPベース生成物は感染済みスポロゾイト、組換えCS蛋白質又はモノマーBT-ペプチドに比較して均一な高抗体力価を有することが認められる。また、その必要はBT免疫原の精製により顕著することにも認められる。

表1: ビーバーゲンの色々な免疫原により誘発され、組換えCS蛋白質とスポロゾイトを用いて決定された抗体力価の比較

あった。

かくして免疫化されたマウスを各2000スポロゾイトと対抗させると、BT-MAP (4) はマウスの80%に完全防御(すなわち、寄生虫血症の防止)をもたらし、BT-MAP (8) はマウスの60%を覆り、BT-MAP (8) はマウスの50%を覆り、BT-MAP (8) はマウスの60%を覆った。

本発明によるMAPは次のようにして合成することができる。

次の略号の幾つかが合成例の中で用いられている:

Boc-L-ヒスチジンカルボニル
TF A-トリフルオロメチル
DMF-ジメチルホルムアミド
DCC-ジシクロヘキシルカルボジイミド
Tos-トリ
Z-ベンジル
Dnp-ジニトロフェニル
ZCl-2-クロロカルボキシ
DIBAL-ジイソプロピルアルミニウム
TFMSA-トリフルオロメチルホルム酸
BSA-ウシの血清アルブミン
HPLC-高性能液体クロマトグラフィー
TBR-直接免疫ラビット
ATP-アデノシントリホスファート
Dnp-ジニトロフェニル
ZCl-2-クロロカルボキシカルボニル
Bz-ベンゾイル
ELISA-酵素免疫吸光検定

実施例1

多量炭素ペプチド合成の一般的方法

ペプチドの合成を伴う8分枝マトリックスの合成をBoc- α -Ala- β -OCH₃、-Pam樹脂に対して、樹脂 0.5gの典型的規模(0.05 mmol)及び合成についての樹脂量換算値 1.0 mmol/g、ただしマトリックスのより高い分枝を用いたときは樹脂レベルより若干低かった)で、段階的固相法(メリフィールド・アル・ビー(Herrifield, R.B.のJ.Am. Chem. Soc., 83, (1961))に準拠して行った。Boc- α -Ala- β -OCH₃による脱離と得られた樹脂のDIEAによる中和後、4-メチルピロリジン、Boc-Lys(Boc)(0.2mmol)の最初形成した対称無水物を用いてDMF中で低分子量の第一レベルの合成を達成し、次いで0.5%で、中でDCCにより再カップリングさせた。第二及び第三レベルを同じプロトコル(protocol)でそれぞれ0.4 mmol及び0.8 mmolの順に活性化されたBoc-Lys(Boc)を用いて合成して8分枝Boc-Lys(Boc)- α -マトリックスを得た。ただし、ペプチド-抗原配列の最終残基のカップリングには1.6 mmolの順に活性化されたアミノ酸が必要である。ペプチド-抗原の合成のための保護基は次の通りである: 3官能性アミノ酸のBoc- α -Ala- β -OCH₃、末端基についてはBoc- α -Ala- β -OCH₃のほかに、樹脂に対してはベンジルアルコール誘導体、即ちArg(Tos)、Asp(Obzl)、Glu(Obzl)、His(Dnp)、Lys(Obzl)、Ser(Bzl)、Thr(Bzl)及びTyr(Bzl)、重量と容量の幾何学的増加の故に、樹脂の α 基を90%とより新しい容量を用いた。TFAによる脱保護(20分)をTFAで2回、各2分間予備洗浄することによって以前に行った。DIEAによる中和はCH₂Cl₂中で行い(5% DIEA)、かつDMFの過

加中和も行った(2% DIEA)。Arg、Asn、Gln及びGlyを除く全残基について第一カップリングを以前に形成した前記対称無水物を用いてCH₂Cl₂中で行い、第二カップリングをDMF中で行った。各カップリングは2時間であった。Boc- α -Ala- β -OCH₃とBoc-Lys(Boc)とのカップリングはすでに形成した1-ヒドロキシベンゾトリアゾールエステルによりDMF中で実施された。Boc-Lys(Boc)とBoc-Arg(Boc)とはジペプチドの形成及びラクトムの形成の危険をそれぞれ避けるためにDCC解離後カップリングさせた。カップリングは全て各サイクル後に定量的エンビドリントス(サリシン・フィッシャー(Sarlin, V.L.)等のAval.kiochem. 1, 17, (1981))でモニターし、そして必要ならばDMF中、50°Cで2時間の対称性無水物の第三のカップリングを用いた(タム・ジュニア・ビー、"Proc. 1st. Pept. Sympo., 第9巻"(ジュー・エム・デーバー(C.N. Deber)、ケー・ディー・コッペル(R.D. Koppel)及びジョー・J.J.))。この合成をN、N-メチルピロリジン、3mmolを含有する無水酢酸/DMF(8 mmol)中でのアセチル化により停止させた。

MAAの完結後、保護されたペプチド-樹脂(0.3 g)をHis(存在する場合)のN¹-ジメチルホルミル保護基を除くためにDMF中で8時間1Mチオホルミルで処理し(反応を完了させるのに必要ならば50°Cで3回)、N-Boc- α -Ala- β -OCH₃に50% TFA/CH₂Cl₂(10 mmol)で5分間処理し、そして粗MAAを得るために同様に同様の低/高-HF法(タム・ジュニア・ビー・ヒース・ダブリュー・エス(Heath, M.F.)及びリフィールド・アル・ビーのJ.Am. Chem. Soc., 105, 5442 (1983))又は低-高TMSA法(タム・ジュニア・ビー、

ヒース・ダブリュー・エフ及びメリフィールド・アル・ビーのJ.Am. Chem. Soc., 105, 5442 (1983))により処理した。この粗ペプチドを次に冷エーテル/メタノール/エタノール(9:1:1、v/v/v、30 mm)で洗浄してp-チオクレゾールとp-クレゾールを除去し、そして0.1 M トリス(Tris)バッファー(pH 8)中8 M 尿素、0.2 M ジオスフェイトール100 mMに抽出した。固相工程で生成した全ての残存アミノ酸生成物を除去するために、透析材料中のペプチド[スベクトル・ボル(Spectra Por.) 6、6 Mのカットオフ1,000]を尿素8 M、NH₄Cl、CO₂(pH 8.0)、0.1 M 含有するpH 8.0の脱炭酸し、かつN₂バブリングされた溶液中で、0.1 Mのメタカプトエタノールとで24時間平衡させた。透析を次に全てpH 8.0の0.1 M NH₄Cl、CO₂、脱炭酸中8 M、次いで2 Mの尿素中で12時間、続いて0.5 M ROAc中で逐次的に掛けて尿素を全て除去した。次いで、凍結乾燥したMAAを高性能のゲル透過クロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーでバッチ式で精製した。精製された物質は全て所定アミノ酸分析をえた。

実施例2

アラキジウム・ファルシニラチのS-1000樹脂の脱離されたペプチドである(A₁-N-A₂-E-A₃-O-P₄)₅-MAA(NP-16 MAA)の合成と精製

ペプチド(A₁-N-A₂-E-A₃-O-P₄)₅-Lys-Lys-Lys-Lys-OHを実験例1に記載の一般的方法で合成した。

この合成はBoc-Lys(Boc)-OCH₃-Pam樹脂(コマリ[スチレン-1%-ジビニルベンゼン樹脂]を用いて置換度 0.11mmol/g-樹脂において開始させた。置換は3レ

ベルのBoc-Lys(Boc)の逐次添加後 0.88mmol/gであることが見いだされ、8分枝構造の(Boc-Lys(Boc))₅(Lys(Boc)-Lys(Boc)-OCH₃-Pam)を生成させた。この合成を改良ベクトラン50合成装置(カリフォルニア州、パロアルト(Palo Alto)のベクトラン・インストラクションズ(Beckman Instructions)中で樹脂 2.5gを用いて続けた。合成はカップリング工程を全自動化したコンピュータプログラムを用いて行った。例えば、Boc-Lys(Boc)とBoc-Arg(Boc)とのカップリングは完全と不完全カップリングを最小限に抑えるCH₂Cl₂:ジメチルホルミルの比率は1(3 v/v)で対称性無水物法により実施された。Boc-Arg(Boc)のカップリングは予備形成した1-ヒドロキシベンゾトリアゾール誘導体エステルによって一歩で完了した。各A₁-N-A₂-E-A₃-O-P₄の収率を最大とし、かつ反応を>99.5%完結まで本質的にもってゆくに二重カップリングを要した。

保護ペプチド-樹脂を部分、部分に分けて脱保護した。最初の脱保護は乾燥済みペプチド-樹脂 1.57 gを用いて反応容器中で実施し、そしてBoc-保護基及び他の外来物質を除去するために次の操作に付した: CH₂Cl₂ (3×1分洗浄); CH₂Cl₂-CH₂Cl₂ (1:1, 3×2分)及び CF₃CO₂H (3×2分洗浄)、次いで次の脱保護試薬: トリフルオロメタンスルホン酸: トリフルオロ酢酸: トリフルオロメタノール-メタノール(m:m:4:1:2:4)を含有する4°Cにおける3.5時間の反応。スルフィド補助脱保護のアジドリシン解離により放出されたペプチドを、-30°Cで予冷されたエーテル溶液(230 mL)で沈殿させた。沈殿物を遠心分離してペレットとなし、そしてエーテルを真空下除去した。ペプチドを次に0.01 M ROAcに溶

解し、そして1.8と0.01M NaOH中で透析した。ペプチドを次に凍乾燥機にて60mmHg ($A = \alpha - D$, $B = \alpha - P$, $C = \beta - P$)、GAPを得た。水解液から得られた樹脂を加水分解すると、ペプチドの約90%が加水支持体から解離されていたことが示された。この低収率はアミノ酸のニータルによる沈殿物が不完全であることによるものであった。同じペプチド-樹脂複合体(1.0g)をHF \cdot N \cdot ニータール($S : V : W$ 、全部で1.0mmole)によっても0.7分で2時間水解させた。1.0~1.00%のHOAcによる高い抽出後に1.20mgのMAPを得た。収率率は33%であった。透析を10% OAcを用いて行った。

透析後のペプチドを次にアミノ酸分析(5 NRCによる加水分解)でまず分析した。見出されたMAPのモル比は $Asn : Ala : Pro : Lys = 1.97(2) : 1.03(1) : 1(1) : 0.26(0.22)$ であった。これはカンコの中に示される予想理論値と一致するものであった。

案例例 9

マラリヤ起源のT-細胞抗原及びB-細胞抗原を含有するジ-エ
ピトープ多量抗原ペプチド合成の一般的法柱

(a) 方法 A: 2 個のエピトープのタンデムでの結合

ジエポキシMAPの合成は、約100°Cに加熱したモノエポキシMAPと同様のBoc- α -Al- OCH_3 -Pam樹脂(0.10mmol)のAlが樹脂1g中に存在する)に対する段階式有機塩基平熱式で達成した。50%TPAによるBoc基の脱離及びDIEAによる得られた塩中のAlの後に、Boc- C_2H_5 (Boc- α -Al- OCH_3 -Pam樹脂を形成する、低体コピー)についての第一レベルの合成をCEC、中でより大規模のBoc- C_2H_5 (Boc)を用い、DCM溶液中より達成した。第二及び

であると思われ、この選択性を利用してこのコアポリリクスの合成を達成するために、 $\text{H}_2\text{N}-\text{I}-\text{Boc}$ 及び $\text{H}_2\text{N}-\text{Fmoc}$ を含有するコアポリリクスを調製する。このコアポリリクスの合成は第一及び第二レベルの分枝のために $\text{Boc-Lys}(\text{Boc})$ を用いる第1級ポリリクに較べたものと同等である。第三レベルにおいては、コアの Lys 分枝のために $\text{Fmoc-Lys}(\text{Boc})$ ($\text{Lys}(\text{Boc})$) を使用して各々について $\text{Lys}(\text{Boc})$ 及び $\text{Fmoc-Lys}(\text{Boc})$ を導入させた。第一エピソード (又はタンダム配置の2つのエピソード) の合成では前記実施例に較べて Boc のベンジル化学を使用したのが、この合成中に中間物を Fmoc の早期脱離を最小限に抑えながら1分に短縮した。第二エピソードの合成では $\text{Fmoc-Lys}(\text{Boc})$ の化学を採用し (即ち、 $\text{H}_2\text{N}-\text{Fmoc}$ を Fmoc で保護し、側鎖を p-Toluenyl コーラル保護基で保護する)、 $\text{Boc-Lys}(\text{Boc})$ / 酸触媒を使用して第一エピソードを完成させたその合成を開始させた。 $\text{Fmoc-Lys}(\text{Boc})$ / 酸触媒の次の繰り返しの3官能性アミノ基を用いて保護基高次共役性として $\text{Glu}(\text{OBu}t)$ 、 $\text{Asp}(\text{OBu}t)$ 、 $\text{Lys}(\text{Boc})$ 、 $\text{Thr}(\text{Bu}t)$ 、 $\text{Ser}(\text{Bu}t)$ 、 $\text{Tyr}(\text{Bu}t)$ 、 $\text{His}(\text{Pmf})$ 、 $\text{Arg}(\text{Pmf})$ 、 $\text{His}(\text{Fmoc})$ 、 $\text{Trp}(\text{Fmoc})$ 及び $\text{Glu}(\text{Bu}t)$ 、 $\text{N-Me-Lys}(\text{Boc})$ の構造異性体はジメチルホルムアミド中10%のベンジリンにより行い、そしてベンジリンによる1部の不溶沈下に続いてDMF中で $\text{DCC}:\text{HOBu}t$ によりアミンを洗提した。合成完結後、MAP樹脂を低真空HFにより処理してペプチド鎖を樹脂から脱離させた。この脱離と精製は第1級実施例に較べたものと本質的に同じである。 Fmoc 、 $\text{Lys}(\text{Boc})$ の化学を採用してこのペプチド鎖を精製する手順は次の通りであった: (1) $\text{DMF}:\text{DMF}:\text{AcOH} = 3:1:1$; (2) ベンジリン/DMF (1:1);

三シレベンの会合を同一プロトンにより行なって8分岐20c-Lys (Boc) のコマトリックスを得た。この点から先きでは、ペプチド抗原又はそのエドープの点では、それらがタンデムで配列され、それらがあたかも1つの抗原であるかのよう地理着されるので、リープトガシカルギニル・ニゾル・膜壁着の手法を使用して前記高価の会合と同等にできる。場合によっては、ナラベグド・G-Lys・Pro・Pro・Pro-G-Lysのようなヌーサーを2つのペプチド抗原間に挿入して柔軟性を出すようにする。会合の光後始、MA・P-留置で20c-Lysを処理してN-Bocを除去した後、次にpH2.5で、10% 60熱水浴/10% D1EAによりアチル化し、最後に低-高pH法により抗原態までMA・Pを樹脂支持体から抽出した。概してペプチドをに際せるMA・Pプロット・ゾール (8:1 5 v/v) で洗脱して1-エトキシ・ニゾルとパーケル・ゾールを除去し、そして0.1M・Tris、pH8緩衝液 (pH8.0) 中8Mの尿素に抽出した。同工程で生成した強芳香基誘導生成物を除去するために、MA・P 8Mの尿液中で透析 (ヌメラル・ポル・6、分子重量カット・1,000)。これは0.1Mの酢酸中で2度5~6時間透析して尿素を除去した。これらのMA・PをHから3間隔抽出して除去を除去した。

(b) 方法B、リンのメノ基の交叉分枝による2以上のロビートンの結合

リシンには2個のアミノ基が存在するので、またこれら2個のアミノ基は選択的に保護することができると思われるので、そのN-ε-N 基を酸に不安定なBoc基で保護し、N-NE 基を塩基に不安定なFmoc (フルオレニルメトキシカルボニル) 基により保護し、または逆も同様で、即ちN-NE 基をFmoc基で保護し、N-ε-N 基をBoc基で保護するそのような順法でコマトリックスに合成

v/v) 20 ml (1分); (5) ビピリジン/DMF (1:1 v/v) 20 ml (10分); (4) DMF 20 ml (3×1分); (5) $\text{Cs}_2\text{C}_2\text{E}_2$ 20 ml (3×1分); (6) DMF 20 ml (2×1分); (7) DMF 5 ml + Mg^{2+} (4当量) (5分); DMF + H_2O (4当量); $\text{Cs}_2\text{C}_2\text{E}_2$, CHCl_3 (4当量) を2時間追加; (8) DMF 20 ml (4×2分); (9) $\text{Cs}_2\text{C}_2\text{E}_2$ 20 ml (2×2分)。

(c) 方法 C. 前記で形成した2つの異性MAPのジスルフィド結合を介して2種以上のエニートPの結合

2種以上のエニートPを介して形成した2種のMAPのジスルフィド結合を介して結合するために、 Cs^+ (Ac^-) - A-E のようなジペプチドを真溶液 R 又は Mg^{2+} に配座するようにして事前に予備形成MAPのカルボキシル基に添加させる。これは常性で達成することができ、次に B-E^- (Cs^+ (Ac^-)) を B-E^- - A^- - O^- - CH^- - P^- - Am^- 配座に付与することによってコアマトリックスの合成を開始させる。ジペプチド - B-E^- - Cs^+ (Ac^-) - A-E - O^- - CH^- - P^- - Am^- 鎖の形成、即ちコアマトリックスの合成の後、前記方法を使用する1種以上のペプチド断片の組み立てを進めて Cs^+ (Ac^-) - A-E - A - ジペプチドCOOH - E の尾を有する上記予備形成MAPを得た。 Cs^+ (Ac^-) はHF脱保護法に対して安定である。このCOOH基 (Cs^+ (Ac^-) - A-E - ジペプチド) の尾を有する予備形成MAPを精製した。2つの異性予備形成MAPの二量化は1 α によるジスルフィドへの酸化により達成されたが、これにより A^- - Am^- のシステイン残基から硫黄原子が付随して起こる。詳細な手順は次に記述通りである。1. $\alpha\alpha\alpha$ のMAPに対して、 Cs^+ (Ac^-) を有する異性の予備形成ジエニートMAPを脱炭素された、

で精製された50%酢酸溶液に室温で溶解し、1%のMeOH溶液(1M溶液)50mlを0.7で1時間パッチ式で加えた。1Mの水性チオ硫酸ナトリウム(又はアスコルビン酸)を黄色が抜かれるまで加えることによって反応を停止させた。MeOHを0.1酢酸中での透析により除去し、そして所望とされたMAPをゲル透過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー又は逆相高圧液相クロマトグラフィーで精製した。

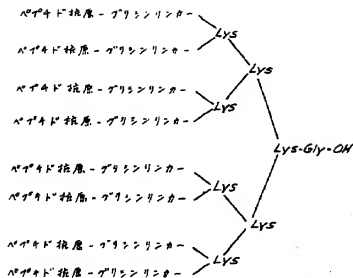
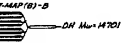
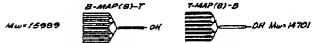
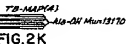
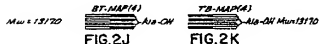
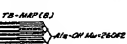
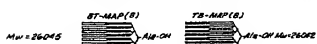
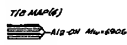
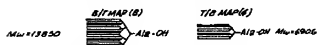
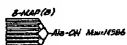
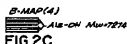
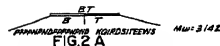


FIG.1

手続補正書 (自発)

平成3年3月5日。



特許庁長官 殿

1.事件の表示

PCT/US99/02039

2.発明の名称

抗マラリアマクチンとして有用な多重抗原
ペプチドの樹木状ポリマー

3.補正をする者

事件との関係 特許出願人
(氏名) ザ ロックフェラー ユニバーシティ (他1名)

4.代理人

〒100
住 所 東京都千代田区有明1丁目7番1号
有明町電気ビル506号室電話(9212)7830番
氏 名 (5910) 弁理士 三宅 正夫 (他1名)

5.補正命令の日付

自 発

6.補正により増加する請求項の数

0

7.補正の対象

特許法第184条の5第1項の規定による審判の特許出願人の代表者の欄、委任状及びその職文、明細書及び請求の範囲の職訳文のタイプ印字(内容に変更なし)

8.補正の内容

方式 (印)
表 示

第1頁の続き

識別記号

厅内整理番号

ZNA Z

8318-4 H
8318-4 H
8318-4 H

⑦発 明 者 ザバラ、フィデル ビイ。

アメリカ合衆国、10012 ニューヨーク、ニューヨーク、ブリーカー
ストリート 110、アパートメント 23エフ

⑦出 願 人 ニューヨーク ユニバーシティ

アメリカ合衆国、10012 ニューヨーク、ニューヨーク、ワシントン スクエア サウス 70